

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-200390

(43)Date of publication of application : 21.07.1992

(51)Int.Cl.

C12P 21/00

(21)Application number : 02-334103

(71)Applicant : YOKOYAMA SHIGEYUKI

(22)Date of filing : 30.11.1990

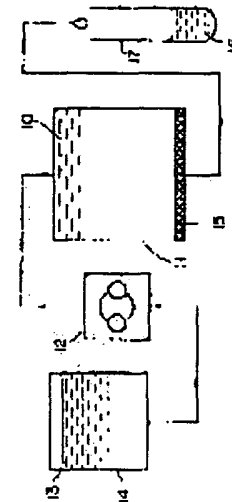
(72)Inventor : YOKOYAMA SHIGEYUKI
ENDOU YAETA
KIKAWA TAKANORI

(54) PRODUCTION POLYPEPTIDE BY CELL-FREE POLYPEPTIDE SYNTHESIS SYSTEM

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the stability and reproducibility of the subject production process by carrying out the synthesis while minimizing the volume of gaseous phase in a specific reactor.

CONSTITUTION: A cell-free polypeptide synthesis system 10 containing the main body such as liposome and tRNA and a substrate such as amino acid and ATP is charged into a reactor 11 in a state free from gaseous phase. A substrate solution 14 stored at $\leq 10^{\circ}\text{C}$ in a substrate solution tank 13 is continuously supplied to the upper part of the reactor 11 with a pump 12 for high-performance liquid chromatography, etc., while preventing the intrusion of gaseous phase into the system. The reaction chamber is maintained at $20-40^{\circ}\text{C}$ to effect the synthetic reaction of a polypeptide. The liquid 16 containing the reaction product is continuously taken out of the system through an ultrafilter 15 placed under the tank 11 to collect the objective polypeptide of a cell-free polypeptide synthesis system in the collection vessel such as fraction collector tube 17.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平4-200390

⑫ Int.Cl.⁴

C 12 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月21日

A
C

8214-4B
8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全7頁)

⑭ 発明の名称 無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法

⑮ 特 願 平2-334103

⑯ 出 願 平2(1990)11月30日

特許法第30条第1項適用 平成2年7月25日、社団法人日本生化学会発行の「生化学 Vol.62, No.7, 1990」に発表

⑰ 発 明 者	横 山	茂 之	東京都文京区向丘1丁目20番16号
⑱ 発 明 者	遠 藤	弥 重 太	山梨県中巨摩郡玉穂町下河東472-304
⑲ 発 明 者	木 川	隆 則	東京都台東区上野桜木町1-5-2
⑳ 出 願 人	横 山	茂 之	東京都文京区向丘1丁目20番16号
㉑ 代 理 人	弁理士	志 賀 正 武	外2名

明 細 書

1. 発明の名称

無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 無細胞ポリペプチド合成系が収容された反応槽に基質溶液を供給しつつ、該反応槽内でポリペプチド合成反応を生じさせ、該反応槽から反応生産物を取り出してポリペプチドを連続的に製造する方法において、

上記反応槽内の気相の存在を最小限に制御しつつ合成反応を生じさせることを特徴とする無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法。

(2) 上記基質溶液を、流路に気相を介在させずに液体を圧送するポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の下側に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すことを特徴とする請求項1に記載の無細胞ポリペプチド合

成系によるポリペプチドの製造方法。

(3) 上記基質溶液を、上記ポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の上側に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すことを特徴とする請求項1に記載の無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法。

(4) 上記基質溶液を、上記ポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の側方に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すことを特徴とする請求項1に記載の無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

「産業上の利用分野」

本発明は、無細胞ポリペプチド合成系によりポリペプチドを製造する方法に係わり、より詳細には反応系に連続的に基質(ATP, GTP, アミノ酸等)を供給し、生成ポリペプチドおよびAMP, GDP, ピロリン酸塩、無機リン酸等のポリペプチド合成生産物を系から取り出すことを特徴とするポリペプチドの製造方法に関する。

なお、ここで言う無細胞ポリペプチド合成系は mRNA の情報を読み取ってリボソーム上でポリペプチドを合成する無細胞翻訳系、もしくは DNA を鋳型として RNA を合成する無細胞転写系と前記無細胞翻訳系の両者を含むもののいずれかを言い、化学的合成法によるポリペプチド合成系は含まない。

また、ここで言うポリペプチドはアミノ酸残基数が複数のものを言い、タンパク質も含まれる。

「従来の技術」

無細胞翻訳系を用いたポリペプチドの製造方法としては、従来、特許出願公表平1-503119号公報に記載された方法が提案されている。

この方法は、内因性および外因性の天然または人工の mRNA を含み、ATP、GTP およびアミノ酸を基質として含んでいるリボソームの無細胞翻訳系において、最終生産物、AMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸を含んでいる翻訳生産物を生成するポリペプチドの製造法において、AMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸および最終

これによって、送液を行おうとするとこの気体部分が圧縮したり、膨張したりするため反応槽1の圧力を制御することが困難であり、安定した基質の送液が行えなかった。

また、反応槽1内の圧力を高くすることが不可能なため、反応槽1内に気泡が発生し、この気相と液相との界面でタンパク質の変性が生じやすかった。

これらの理由により、上述した従来法ではポリペプチドを合成する際の再現性が著しく悪かった。

本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、気体を介さずに送液を行うことにより、反応槽1内の制御性や送液の安定性を向上させ、ポリペプチドを合成する際の再現性を向上させることのできるポリペプチドの製造方法を提供することを目的としている。

「課題を解決するための手段」

かかる課題は、無細胞ポリペプチド合成系が収容された反応槽に基質溶液を供給しつつ、該反応槽内でポリペプチド合成反応を生じさせ、該反応

生産物であるポリペプチドを含んでいる翻訳生産物を、前記系から取り出し、それと同時にアミノ酸、ATP および GTP の影響の基質をそれらが初期濃度を維持するために前記系へ送り出すポリペプチドの製造方法である。

第6図は、上記従来法において使用される製造装置を例示するものであって、この装置は、限外ろ過器2を備え、無細胞翻訳系を収容する反応槽1内に、基質溶液タンク3から基質溶液4を連続的に供給し、反応槽1内で合成反応を生じさせ、反応槽1から反応生産物を含む液5を取り出すように構成されている。基質溶液タンク3は窒素ガス(N₂ガス)により加圧され、基質溶液4を反応槽1に圧送するとともに、反応槽1が加圧され、限外ろ過器2を通して反応槽1内の反応生産物を含む液を系外に取り出すようになっている。

「発明が解決しようとする課題」

従来の方では、基質溶液4の送液と限外ろ過器を備えた反応槽1への加圧には、窒素ガスを用いていたため、系内に気体部分6が存在した。

槽から反応生産物を取り出してポリペプチドを連続的に製造する方法において、上記反応槽内の気相の存在を最小限に制御しつつ合成反応を生じさせることによって解消される。

また上記基質溶液を、流路に気相を介在させずに液体を圧送するポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の下側に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出しても良い。

さらに上記基質溶液を、上記ポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の上側に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すこともできる。

さらにまた、上記基質溶液を、上記ポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の側方に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すこともできる。

以下、図面を参照して本発明を詳細に説明する。

本発明において使用される無細胞ポリペプチド合成系としては、リボソーム、tRNA、mRNA、あるいはDNA等の本体と、アミノ酸、ATP、

GTP、CTP、UTP等の基質とを含み、これらを含む溶液を、気相を含まない状態で反応槽1内に収容したものが使用される。

上記合成系の本体は、合成系を20～40℃の適宜な温度に保つことにより、アミノ酸、ATP、GTP、CTP、UTP等を基質およびエネルギー源とし、mRNAもしくはDNAの情報を元に、ポリペプチドを合成する。

合成されるポリペプチドとしては、各種の酵素やホルモンなどのタンパク質等が合成可能である。合成されるポリペプチドの種類は、合成系本体の情報によって決定される。

第1図は、本発明によるポリペプチドの製造方法の第1の例を説明するための図である。この例では、無細胞ポリペプチド合成系10を気相を含まない状態で反応槽11に収容し、系内に気相を介することなく液体を圧送するポンプ12によって基質溶液タンク13内の基質溶液14を反応槽11の上側から連続的に圧送し、反応槽11内でポリペプチド合成反応を生じさせ、反応槽11の

下側に設けられた限外ろ過器15を通して反応槽11内の反応生成物を含む液16を系外に取り出し、反応生成物を連続的に生産する。系外に取り出された反応生成物を含む液は、フラクショナルレクターチューブ17などの採取容器に採取する。なお反応槽11内はマグネチックスターラーなどを用い攪拌状態としても良い。

上記ポンプ12は、系内に気相を介することなく、脈流が少なく、圧力、流量の制御が可能なのが使用され、プランジャーポンプ、ローラーチューブポンプ、ダイヤフラムポンプ、ペローズポンプ、ロータリーポンプなどが使用され、より具体的には、高速液体クロマトグラフィー用ポンプ、中圧液体クロマトグラフィー用ポンプ、低圧液体クロマトグラフィー用ポンプが好適に使用される。

このポンプ12による基質溶液の圧送量は、通常は一定に設定されるが、反応時間の経過とともに圧送量を増加させあるいは減少させても良い。

上記限外ろ過器15は、反応槽11内に収容されたリボゾームやRNAあるいはDNA等の合成

系本体を透過させることなく、合成されたポリペプチド、基質あるいはその分解物(AMP、GMP、ポリリン酸塩、無機リン酸塩など)を透過させるような孔径を有するろ過材を備えたものが使用される。

上記基質溶液タンク13内の基質溶液14は、10℃以下の温度で保存するのが望ましく、また反応槽11内は20～40℃に保温するのが望ましい。

この例によるポリペプチドの製造方法では、基質溶液14を、流路に気相を介在させずに液体を圧送するポンプ12で反応槽11内に連続的に圧送し、反応槽11内の下側に設けられた限外ろ過器15を通して反応生成物を含む液16を取り出し、系内に気体部分を含まずに反応生成物を連続的に生産することにより、反応槽11内の圧力制御や基質溶液14の送液を安定して行うことができる。

また、このことから反応槽11内の圧力を高くすることが可能となり、反応槽11内での気泡の

発生を抑えることが可能となる。従って気相と液相との界面で生じるタンパク質の変性を防ぐことができる。

これらのことからこの製造方法では、無細胞ポリペプチド合成系においてポリペプチドを合成する際の再現性を大巾に向上させることができる。

第2図は、本発明によるポリペプチドの製造方法の第2の例を説明するための図である。この例では、上側に限外ろ過器15を設け、下側に基質溶液の供給口19を設けた反応槽18を用い、この反応槽18内に無細胞ポリペプチド合成系を収納し、ポンプ12により圧送される基質溶液14を供給口19から導入し、上側の限外ろ過器15を通して反応生成物を含む液16を系外に取り出し、反応生成物を連続的に製造する方法である。

この第2の例では、反応槽18の下側から基質溶液14を供給し、上側に限外ろ過器15を設けて反応液を取り出すようにしたので、万一反応槽18内に気泡が生じても、気泡が直ちに上側の限外ろ過器15を通過して系外に排出されるので、送

液の供給量や系内の圧力制御を安定に保ち、タンパク変性を防止する効果を一層確実にすることができ、ポリペプチドを合成する際の再現性をさらに向上させることができる。また反応槽18内の気泡を直ちに除去することが可能なことから、装置の運転が容易となる。

第3図は、本発明によるポリペプチドの製造方法の第3の例を説明するための図である。この例では、右側に限外ろ過器15を設け、左側に基質溶液の供給口を設けた反応槽11を用い、この反応槽11内に無細胞ポリペプチド合成系を収納し、ポンプ12により圧送される基質溶液14を導入し、上側の限外ろ過器15を通して反応生成物を含む液16を系外に取り出し、反応生成物を連続的に製造する。このようにしても反応槽11内に気泡が生じるのを防止できる。

なお、本発明においては、反応槽内の気泡発生を防ぐために、次に記するような各種の気泡防止手段を用いることもできる。

①予め基質溶液を加熱、超音波処理または真空

引きにより脱気する。

②基質溶液タンクとポンプの間に、減圧下にある特殊合成高分子チューブ(溶液は透過せず、溶解ガスのみを透過させる高分子膜)を通すことにより脱気する。

③基質溶液がポンプに入る手前で、基質溶液を反応槽温度までもしくはそれ以上まで加熱し、発生した気泡をエアトラップにより分離する。

以下、実施例により本発明の効果を明確にする。

〔実施例〕

第1図に示す製造装置を構築し、ポリペプチド合成を実施した。

無細胞ポリペプチド合成系としてはZubayらの開発した大腸菌のS30抽出液を用いる転写翻訳共役系(Zubay G. (1973) *Annu. Rev. Genet.* 7, 267-287)を用い、CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)を合成させた。

①大腸菌S30抽出液の調製

Zubayらの方法にしたがって、大腸菌A19株

(*rna^{met}*)から調製した。

②プラスミドDNA

転写翻訳共役系において、CATを効率よく発現するように作製したプラスミドDNA pACL6を用いた。

③連続無細胞タンパク質合成反応は、容量1mlの反応槽で行った。ここに170μlの大腸菌S30抽出液、100μg pACL6 DNA、17.4μg tRNAを含む、基質溶液(55.0mM トリス酢酸溶液(pH 8.2)、1.65mM DTT、1.22mM ATP、0.84mM CTP・GTP・UTP、27.0mM ホスホエナールビルビン酸エステル、1.9%ポリエチレングリコール-6000、34.4μg/ml フォリン酸、0.54mM 3',5'-サイクリックAMP、36.0mM 酢酸アンモニウム、72.0mM 酢酸カリウム、9.7mM 酢酸カルシウム、10.0mM 酢酸マグネシウム、0.35mM のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸が反応液として入っている。この反応槽を37℃に加熱し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

用のポンプ(東ソー社製、CCPM)を用いて基質溶液を反応槽に供給し、同時に分画分子量10万ダルトンの限外ろ過膜YMI00(アミコン社製)を通して、反応生成物および反応に用いられたヌクレオチド、アミノ酸等の低分子量の基質を反応液から取り出した。なお基質溶液の供給量は2ml/時間に設定した。また基質溶液は約4℃で保存した。

以上のようなシステムを用い、17時間にわたり無細胞ポリペプチド合成系によりタンパク質(CAT)の合成を行った。基質溶液の供給は、17時間にわたって極めて安定していた。

単位時間当りのCATの合成量は流出液のCAT活性を指標として見た。CAT活性測定法は次の操作により行った。

1) 1.5mlのエッペンドルフチューブに¹⁴C-クロラムフェニコールを3.7kBq、アセチルCoA(80nmol)とサンプル溶液を加え、最終濃度0.2Mトリス塩酸溶液(pH 7.5)で全量を180μlとする。

2) 37℃で30分間インキュベーションする。
3) 水冷して反応を止め、1 mlの酢酸エチル(0.1 ~ 1.0 g/mlのクロラムフェニコールを含む)を加え、数秒攪拌する。

4) 静置した後、下層(水層)200 μlを取り除く。酢酸エチルを窒素ガスで蒸発させ、再び20 μlの酢酸エチルを加えて再溶解し、ワットマンLK6DF TLCプレートにスポットする。

5) クロロホルム:メタノール(94:6)で平衡化したタンク内で展開する。展開後プレートを乾燥させ、Hyperfilm-β maxなどのフィルムを用いオートラジオグラフィーを行う。CAT活性によるが通常16時間以上露出させる。

このCAT活性測定法により反応液中のCAT活性を測定しその結果を第4図に示した。第4図において1番左のレーン[S]は供給する基質溶液の、1つおいてそれぞれ5時間後[5]、8時間後[8]、11時間後[11]、14時間後[14]、17時間後[17]の流出液のCATアッセイである。CATの合成は各時間で安定して行なわれており、

「発明の効果」

以上説明したように、本発明によるポリペプチドの製造方法では、無細胞ポリペプチド合成系内に気体部分を存在させずに基質溶液を連続的に圧送しつつ、反応生成物を系外に取り出してポリペプチドを連続的に生産することにより、反応槽内の圧力制御や基質溶液の送液を安定して行うことができる。

また、このことから反応槽内の圧力を高くすることが可能となり、反応槽内での気泡の発生を抑えることが可能となる。従って気相と液相との界面で生じるタンパク質の変性を防ぐことができる。

これらのことから、無細胞ポリペプチド合成系においてポリペプチドを合成する際の再現性を大巾に向上させることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法の第1の例を説明するための概略構成図、第2図は、同ポリペプチドの製造方法の第2の例を説明するための概略構

成図、第3図は、同ポリペプチドの製造方法の第3の例を説明するための概略構成図、第4図は、実施例の結果を示す図でCAT活性測定結果を示す図、第5図は同実施例で製造したCATの電気泳動結果を示す図である。

このようにして合成したCATを含む流出液からCATのアフィニティークロマトグラフィーによりCATを精製した。この精製したCATを、1.4 ~ 6.6万ダルトンの分子量マーカーとともにSDSポリアクリルアミド電気泳動で分析し、クマジーブリリアントブルーで染色した。その結果を第5図に示した。CAT(分子量2.5万ダルトンの三量体)に相当する位置に単一のバンドが見られ、クマジーブリリアントブルー-C-250で十分に染色できる量のCATを、無細胞ポリペプチド合成系から得ることができた。この結果からCATの合成量は0.1 ng程度と見積もることができた。

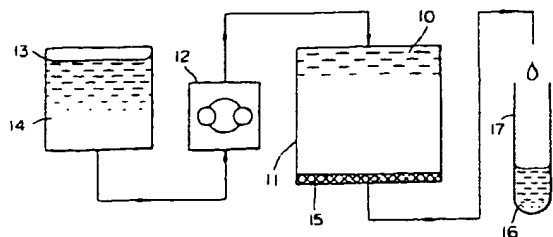
成図、第3図は、同ポリペプチドの製造方法の第3の例を説明するための概略構成図、第4図は、実施例の結果を示す図でCAT活性測定結果を示す図、第5図は同実施例で製造したCATの電気泳動結果を示す図である。

第6図は、従来の無細胞翻訳系によるポリペプチドの製造方法を説明するための概略構成図である。

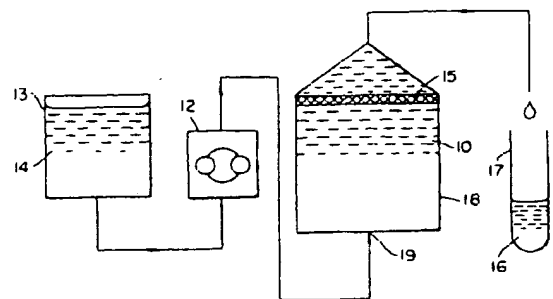
- 1 0 … 無細胞ポリペプチド合成系
- 1 1, 1 8 … 反応槽
- 1 2 … ポンプ
- 1 3 … 基質溶液タンク
- 1 4 … 基質溶液
- 1 5 … 限外ろ過器
- 1 6 … 反応生成物を含む液

出願人 横 山 茂 之

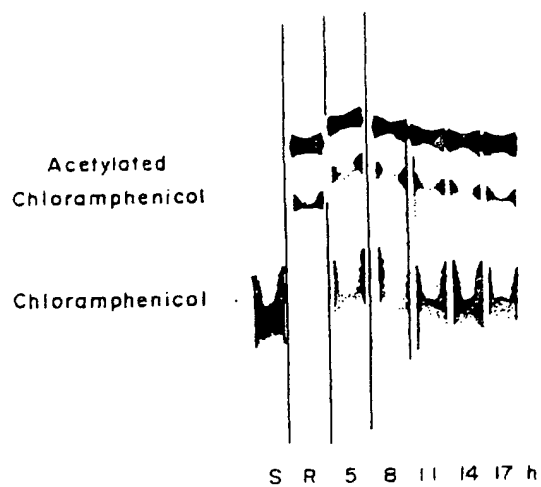
第 1 図



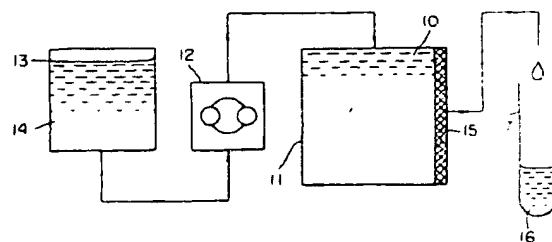
第 2 図



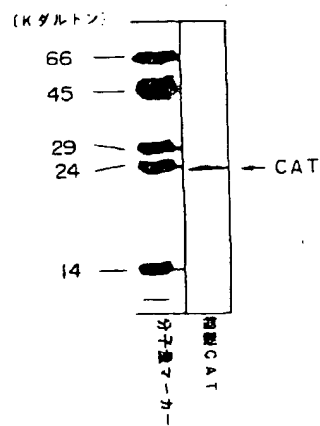
第 4 図



第 3 図



第 5 図



第 6 図

